Zur Kenntnis der Fermente der Bakterien.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

von der Hohen Medizinischen Fakultät

an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Dr. phil. Ludwig Pincussohn

aus Berlin.

Tag der Promotion: 10. Juni 1910.

ACAD. LOCO BAT. HERL.

Straßburg

Verlag von Karl J. Trübner

1910.

164

Referent: Geh. Rat Prof. Dr. **Flügge.**

M. DuMont Schauberg, Strassburg.

Meiner Frau.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535712_0126

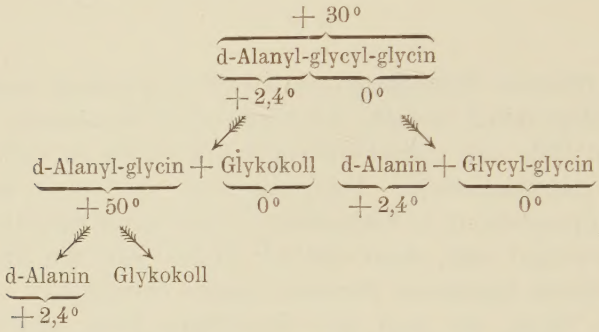
In früheren Mitteilungen ist darauf hingewiesen worden, daß die Möglichkeit besteht, den Stoffwechsel bestimmter Zellarten mit Hilfe von optisch-aktiven Polypeptiden zu verfolgen und zu charakterisieren. Verwenden wir synthetisch dargestellte Polypeptide, d. h. Verbindungen, über deren Struktur wir genau orientiert sind, dann sind wir in der Lage, die Art des Abbaus durch bestimmte Fermente genau festzustellen.

Die Wege, die man hier einschlagen kann, sind zwei. Erstens kann man das Ferment auf das betreffende Polypeptid einwirken lassen und die Abbauprodukte auf chemischem Wege isolieren. Derartige Versuche sind von Emil Fischer, Emil Abderhalden und ihren Mitarbeitern in großer Zahl ausgeführt worden. Ein anderer Weg ist durch die von Abderhalden eingeführte «optische Methode» gegeben.[1]) Das Wesen dieser ist kurz folgendes. Fülle ich die Lösung des Polypeptids, das als Substrat dient, mit der Fermentlösung zusammen in ein Polarisationsrohr, so wird das Gemisch eine gewisse Drehung im Polarisationsapparat geben. Tritt nun eine Wirkung des Fermentes auf, bei der Substanzen sich bilden, die die Ebene des polarisierten Lichtes in anderem Sinne beeinflussen, so wird sich dies durch eine veränderte Drehung kundgeben; umgekehrt werden wir aus einer Änderung der Drehung auf eine eingetretene Fermentwirkung schließen können.

Gehen wir von einem bekannten Polypeptid aus, z. B. von dem Tripeptid d-Alanyl-glycyl-glycin, so wissen wir genau, welche Abbaustufen bei einer reinen Hydrolyse entstehen können. Es sind als letzte Endprodukte nur die Bausteine möglich und als Zwischenprodukte die Dipeptide d-Alanyl-glycin und Glycyl-glycin. Wir sind in der Lage, die Art des Abbaus aus der Art der Änderung des ursprünglichen Drehungsvermögens zu

folgern, und können außerdem jederzeit die Hydrolyse abbrechen und durch Isolierung der Spaltprodukte unsere Schlüsse erhärten.

Über die Verhältnisse beim Abbau dieses Polypeptids gibt das nachfolgende Schema Auskunft.



Es erhellt aus diesem, daß die Anfangsdrehung entweder herauf oder herunter gehen kann, je nachdem, an welcher Stelle die Sprengung der Polypeptidkette erfolgt. Als Beispiel sei angeführt, daß Hefepreßsaft das Tripeptid so angreift, daß zuerst d-Alanin abgespalten wird. Das Drehungsvermögen sinkt kontinuierlich ab. Anders verhält es sich z. B. mit der fermentativen Wirkung von Preßsäften, die aus Carcinomgeweben mit Hilfe der Buchnerschen Presse durch einen Druck von 300 Atmosphären hergestellt worden sind. Läßt man solchen Saft auf eine Lösung des genannten Tripeptids wirken, so findet zunächst ein Ansteigen des Drehungsvermögens statt. Das Tripeptid, das eine spezifische Drehung von + 30° besitzt, wird zunächst in d-Alanyl-glycin, dessen Drehung + 50° beträgt, und das optisch inaktive Glykokoll aufgespalten. Nach einiger Zeit tritt auch hier eine Drehungsabnahme auf: es zeigt uns dies an, daß das d-Alanyl-glycin nunmehr in seine Endprodukte, das d-Alanin mit einer Drehung von + 2,4° und das inaktive Glykokoll, zerfallen ist.

Infolge der großen Schwierigkeiten bei der Herstellung größerer Mengen solcher Polypeptide suchten wir, für diese einen Ersatz zu schaffen. Ein solcher Ersatz sind Peptone, die aus bestimmten Eiweißkörpern, z. B. aus Seide, nach einer

genau bestimmten Methode hergestellt werden, über die im experimentellen Teil näher berichtet werden wird, und die dann eine recht konstante Zusammensetzung zeigen. Mit solchen Peptonen sind im hiesigen Institute schon eine große Menge von Fermentversuchen angestellt worden. Der Abbau eines solchen Peptons ist fast ebenso typisch wie der eines Polypeptids bekannter Zusammensetzung; ihre Verwendung zu Versuchen über die Wirkung von Fermenten erscheint darum durchaus berechtigt.

Die Methode erlaubt also ein sonst kaum mögliches Eindringen in die Stoffwechselvorgänge einzelner Gewebe und Zellen, vor allem auch in die Eigenart der Mikroorganismen. Es ist oben schon der Hefezellen gedacht worden; mit dem Saft, der aus ihnen durch feinstes Zerreiben und Auspressen der Zelltrümmer mit der hydraulischen Presse nach Buchner hergestellt worden ist, sind eine große Anzahl von Versuchen angestellt worden. Die spaltende Wirkung des Hefepreßsaftes diente bei vielen im Physiologischen Institut der tierärztlichen Hochschule angestellten Versuchen geradezu als Paradigma. Die Spaltung von Polypeptiden sowie von deren Ersatzmitteln, den Peptonen, durch Hefepreßsaft ist eine ganz typische. Wie in dem vorhergehenden Beispiel schon gezeigt wurde, wirken die Zellen von Krebsen unter bestimmten Umständen in ganz anderer Art spaltend ein. In ähnlicher Weise wurden auch für andere Zellen die Bedingungen der Spaltung untersucht; so zeigten Preßsäfte aus Pilzen ganz typischen Abbau des Substrates.[8]) Es ist von hier nur ein Schritt zu den Bakterien. Auch hier wird man zu sehen haben, ob durch die Bakterien selbst oder ihre Leibesprodukte fermentative Vorgänge bestimmter Art ausgelöst werden, eine Frage, deren Lösung uns vielleicht wertvolle Aufschlüsse liefern kann.

Die ersten Versuche auf diesem Gebiete wurden mit dem Rotzbazillus angestellt. Zur Anwendung kamen Schüttelextrakte. Es zeigte sich, wie die Kurven im experimentellen Teile ergeben, eine deutliche Einwirkung auf die angewandten Peptone. Es ist zu hoffen, daß es gelingen wird, diese Resultate für die Diagnose der Rotzkrankheit zu verwerten. Eine

große Reihe von Versuchen über diese Frage sind unter der Leitung von Professor Abderhalden im Gange.

Ein weiteres Problem ist die Frage, ob es möglich ist, mit Hilfe der optischen Methode Toxin und das dazugehörige Antitoxin mit Umgehung des Tierversuches aufeinander einzustellen. Wir prüften zunächst Toxin und Antitoxin für sich. Es zeigte sich keine Änderung im ursprünglichen Drehungsvermögen. Nun ließen wir Toxin und Antitoxin auf Peptone einwirken. Es zeigte sich, daß eine deutliche Änderung des ursprünglichen Drehungsvermögens eintrat. Beide bauten offenbar das zugesetzte Pepton ab. Auch Eiweißlösungen wurden angegriffen. Wurden Diphtherietoxin und -antitoxin gemischt, dann war bei bestimmter Konzentration keine Wirkung mehr erkennbar. Weitere Versuche müssen ergeben, ob eine bestimmte Grenze existiert, bei der die Wirkung von Toxin und Antitoxin aufgehoben wird. Wir haben auch aus Diphtheriebazillen ein Pepton gewonnen und mit diesem Versuche angestellt. Die erhaltenen Resultate sind aus den Kurventafeln zu ersehen. Erwähnt seien noch Versuche mit Antistreptococcenserum (Höchst), Tuberkulin (Höchst). Auch mit anderen Toxinen wurden Versuche ausgeführt, so mit Ricin und Cobragift. In allen Fällen ließ sich ein deutlicher Einfluß auf das ursprüngliche Drehungsvermögen der angewandten Peptone feststellen.

Eine andere Reihe von Versuchen bildet eine Fortsetzung der Fragen, die vor mehr als Jahresfrist in Angriff genommen wurden.[5–7]) Wie Abderhalden mit Deetjen und Oppler[3–4]) festgestellt hat, enthält das Plasma oder Serum des Pferdes keine peptolytischen Fermente, während solche dagegen in den Blutkörperchen in reichlicher Menge vorhanden sind. Ebenso ist es mit dem Serum der meisten anderen Tiere, wenn auch hier individuelle Unterschiede bestehen. Nur das Serum einzelner Tiere, des Meerschweinchens, des Kaninchens, der Maus, Ratte weisen solche Fermente auf. Diese sind imstande, das Dipeptid Glycyl-l-tyrosin in seine Komponenten zu zerlegen, eine Fähigkeit, die den anderen untersuchten Seren abgeht, und die, wie schon in der eben erwähnten

Arbeit angedeutet, mit dem großen Komplementgehalt des Meerschweinchenserums in irgend welcher Weise im Einklang steht. Wenn man Tiere, Kaninchen und Hunde, mit artfremdem Eiweiß vorbehandelte, zeigten sich neue Erscheinungen. Wir injizierten Kaninchen und Hunden wiederholt teils Eiereiweiß, teils Pferdeserum und prüften nach einiger Zeit das Verhalten des Plasmas gegen solche Polypeptide, die von dem Plasma der unbehandelten Tiere nicht beeinflußt wurden. Die erhaltenen Spaltprodukte wurden auf chemischem Wege isoliert, und es ergab sich als sicheres Resultat, daß das Plasma der mit artfremdem Eiweiß vorbehandelten Tiere die untersuchten Polypeptide in höherem Maße abbaute als das der normalen Tiere. Man kann aus diesem Verhalten wohl auf einen höheren Gehalt an peptolytischen Fermenten schließen. Eine Fortsetzung fanden diese Untersuchungen in weiteren Beobachtungen von Abderhalden mit Weichardt und Pincussohn.[6–9]) Es handelte sich vor allem darum, festzustellen, ob die im Plasma resp. Serum auftretenden Fermente irgend eine Spezifität zeigen. Diese Frage wurde auf Grund der Versuche verneint und zwar zeigte es sich, daß nicht nur Proteine, sondern auch hohe Abbauprodukte, Peptone, imstande sind, die Bildung von Fermenten im Blut hervorzurufen. Auch sonst zeigen diese neugebildeten Agentien Eigenschaften, die manchen Antikörpern, wie z. B. den Präzipitinen, abgehen: durch Erwärmen auf 60—65° werden sie inaktiviert; ein so behandeltes Serum übt keine spaltende Wirkung mehr aus. Wie eben schon erwähnt, sind die gebildeten Fermente nicht spezifisch auf irgend welche Substrate eingestellt. Durch eine Reihe von Versuchen, die Abderhalden mit seinen Mitarbeitern vorgenommen hat, konnte gezeigt werden, daß durch die verschiedensten Eiweißstoffe, z. B. durch Gliadin, Eiereiweiß, Edestin, Eiweiß aus Kürbissamen, Casein die Bildung solcher Fermente hervorgerufen wird, die andererseits wieder auf Peptone verschiedenster Provenienz wirken.*)

*) Auch die Art, wie das Eiweiß zugeführt wird, ist auf die Bildung des spaltenden Fermentes ohne Einfluß. Überfüttert man einen Hund

Jedoch ist die Bildung dieser Fermente insofern spezifisch, als sie nur durch Einführung von Eiweiß oder hohen Eiweißspaltprodukten erfolgt. Durch Zufuhr von Fett, Kohlehydraten und indifferenten Stoffen wie Salzlösungen, wurde eine Reaktion nicht ausgelöst; ebensowenig erfolgte eine solche bei Einführung von jodiertem Pepton. Es sei hierbei auf die Versuche von Obermayer und Pick[12]) hingewiesen. Während es noch nicht gelungen ist, auf ähnliche Weise die Bildung von fettspaltenden Fermenten im Blut anzuregen — Versuche hierüber sind noch im Gange —, hat Abderhalden mit Brahm durch Zuführung von Kohlehydraten Fermente im Blut erzeugen können.[2]) Nach Injektion von Rohrzucker war das Serum des behandelten Hundes befähigt, Rohrzucker in Traubenzucker und Fruchtzucker aufzuspalten, während das normale Serum diese Eigenschaft nicht besitzt. Alle diese Versuche wurden mit der optischen Methode ausgeführt.

Eine Frage, die nun nahe lag, war die, wie sich Plasma und Serum desselben Blutes in ihrer spaltenden Kraft verhalten, wenn man das Tier nach der oben skizzierten Art mit einem Eiweißkörper vorbehandelt. Wie im experimentellen Teil gezeigt werden wird, verhalten sich Plasma und Serum in ihren fermentativen Eigenschaften gegenüber Proteinen und Peptonen durchaus kongruent.

Eine weitere Frage ist die, wie lange die durch die Vorbehandlung dem Blutserum erteilte fermentative Wirksamkeit anhält. Schon in einer früheren Arbeit konnte festgestellt werden, daß das Serum von vorbehandelten Tieren noch nach 4 Wochen peptolytische Wirksamkeit zeigte; durch die jetzigen Versuche ist dieses Resultat bestätigt worden. Wann tritt nun das spaltende Vermögen zuerst im Blute auf? Mannigfache Versuche haben gezeigt, daß in den ersten Tagen nach der Injektion eines artfremden Eiweißstoffes das spaltende Ver-

---

mit Eiereiweiß, so daß unverändertes Eiweiß in die Blutbahn gelangt, so wird ebenfalls die Bildung von Fermenten angeregt. Besonders dieser letztere Umstand gibt uns wohl das Recht, die Bildung solcher Fermente als eine Schutzmaßregel des Organismus aufzufassen.

mögen nicht oder nur in sehr geringem Maße ausgebildet war. Erst nach mehreren Tagen konnte eine deutliche Wirksamkeit bemerkt werden. Die hierzu gehörigen Versuche im experimentellen Teil ergeben, daß bei mit Hammelserum oder mit Rinderserum vorbehandelten Hunden eine deutliche Spaltung vor dem 6. Tage nicht auftritt. Es sei hierbei noch bemerkt, daß auch die Wiederholung der Injektion nach kurzer Zeit kein früheres Auftreten der Fermente im Blute hervorzurufen vermag. Wie bekannt, findet auch die Ausbildung der Immunitätsreaktionen, wie z. B. der Präzipitinreaktion, nicht unmittelbar nach der Vorbehandlung des Tieres statt; es vergehen stets einige Tage, bis die Reaktion scharf zum Ausdruck kommt. Um zu entscheiden, ob zwischen dem Auftreten solcher Immunitätsreaktionen — als einfachste wählte ich die Präzipitinreaktion — und der Fermentbildung ein Parallelismus besteht, ist der Hund als Versuchstier nicht geeignet, da er, wie bekannt, Präzipitine nicht zu bilden vermag. Ein geeignetes Versuchstier ist für diese Frage das Kaninchen. Die Resultate, die ich hier erhielt, zeigten, daß das Auftreten der Präzipitinreaktion und der Fermentbildung ungefähr gleichzeitig erfolgte; es scheint, daß man aus diesen Ergebnissen auf einen gewissen Parallelismus schließen darf, eine Frage, die natürlich noch weitere Ausarbeitungen erfordert.

Experimenteller Teil.

Die hier geschilderten Versuche wurden sämtlich mit der «optischen Methode» ausgeführt, deren Prinzip im theoretischen Teile schon kurz skizziert wurde. Zur Ausführung der Polarisationen diente ein großer Halbschattenapparat der Firma Schmidt & Haensch mit dreiteiligem Gesichtsfeld. Als Lichtquelle wurde ein Auerbrenner benutzt, der in einer besonders dazu konstruierten Lampe montiert war. Das Licht passierte zunächst eine Mattscheibe zur Erzielung einer größeren Gleichmäßigkeit, und sodann zur Herstellung von Licht gleichmäßiger

Wellenlänge ein aus einer 3 cm langen Schicht einer gesättigten Kaliumbichromatlösung bestehendes Filter. Die Skala des Apparates ist in $^1/_4$-Grade geteilt; zur feineren Ablesung dient ein in 25 Teile geteilter Nonius. Die Empfindlichkeit des Apparates ist so groß, daß $^1/_{100}$-Grade abgelesen werden können. Die Fehlergrenze beschränkt sich für jemand, der im Arbeiten mit dem Apparat geübt ist, auf $^1/_{100}$ bis höchstens $^2/_{100}$-Grade. Es versteht sich von selbst, daß vor jeder Ablesung der Nullpunkt festgestellt wurde. Die in den Tabellen verzeichneten Werte sind absolute.

Zur Anstellung der Reaktion dienen Polarisationsröhren von 5 und 10 cm Länge, die um das innere Rohr herum einen Mantel besitzen. Der Zwischenraum zwischen eigentlichem Polarisationsrohr und Mantel wird mit Wasser angefüllt. Das Einfüllen der Reaktionsgemische erfolgt durch einen dem Polarisationsrohr oben aufgesetzten Tubus; dieser ermöglicht zugleich eine geringe Ausdehnung der eingefüllten Flüssigkeit bei Temperaturerhöhung. Im ganzen ähneln die Röhrchen denen, die in der Gärungschemie Verwendung finden. Zur Anstellung der Versuche wurden die betreffenden Mischungen aus Substrat, dem auf seine Fermentwirkung zu prüfenden Agens und der zur Auffüllung nötigen Menge physiologischer Kochsalzlösung so schnell als möglich hergestellt, in das Rohr eingefüllt und tunlichst sofort die erste Ablesung gemacht. In vielen Fällen behielt die zu untersuchende Mischung während der ganzen Versuchsdauer das anfängliche helle, durchsichtige Aussehen, sodaß die Versuche ohne Mühe ausgeführt werden konnten. In manchen Fällen tritt ein Dunkeln des Reaktionsgemenges auf, das die Ablesung sehr erschweren, bisweilen auch unmöglich machen kann. Welches der Grund für diese Erscheinung ist, konnte mit Sicherheit noch nicht aufgeklärt werden. In anderen Fällen bilden sich im Lauf der Reaktion Niederschläge, Präzipitate. Sobald die Bildung von Trübungen eintritt, ist ein Ablesen nicht mehr möglich. In diesem Falle muß man abwarten, bis die Niederschläge sich zu Boden gesenkt haben und eine weitere Ablesung tunlich ist. Während der ganzen Versuchsdauer wurden die Polarisationsröhren in

einen auf 37° gehaltenen Trockenschrank gestellt und nur zu den Ablesungen so kurz als möglich herausgenommen. Eine Konstanthaltung der Temperatur während dieser kurzen Zeit war durch den Wassermantel der Röhren gewährleistet.

Die Resultate werden in Kurvenform in den nachstehenden Versuchen gegeben. Diese Art der Registrierung hat sich uns schon bei früheren Arbeiten als sehr zweckmäßig erwiesen, da sie ohne Mühe die erhaltenen Resultate abzulesen und zu vergleichen gestattet.

Als Substrat der Fermentwirkung wurden Peptone und genuine Eiweißkörper angewandt. Von den Peptonen wurden solche aus Seide, Gelatine, Edestin, Eieralbumin und Casein hergestellte benutzt. Die Darstellung solcher Peptone erfolgte, um möglichst vergleichbare Präparate zu haben, in ungefähr der gleichen Art. Als Beispiel soll die Darstellung des Peptons aus Seide beschrieben werden. 500 g Seidenabfälle der Mailänder Grège werden mit 2500 ccm kalter 70%iger Schwefelsäure übergossen und das Gemisch bei Zimmertemperatur während 72 Stunden sich selbst unter gelegentlichem Umrühren überlassen. Das Reaktionsprodukt wird mit festem Baryumhydrat annähernd neutralisiert. Es wird filtriert, der Rückstand gut ausgekocht und das Filtrat mit Baryumhydrat und Schwefelsäure absolut Schwefelsäure- und Baryumfrei gemacht. Das Filtrat vom Baryumsulfatniederschlag wird unter stark vermindertem Druck bei ungefähr 45° des Wasserbades stark eingeengt, der Rückstand mit der gleichen Menge Methylalkohol verdünnt und die Mischung in das 3—4fache Volumen absoluten Äthylalkohols im dünnen Strahl eingegossen. Zur besseren Abscheidung des amorph ausfallenden Peptons wird das Gefäß in Kältemischung gestellt, nach Absitzen des Seidenpeptons die überstehende Flüssigkeit abgegossen und der Rückstand mit absolutem Alkohol in der Kälte nachgewaschen. Nach Abgießen des Alkohols wird das Pepton in eine Schale übergeführt und im Exsikkator unter fortlaufender Evakuierung während mehrerer Tage getrocknet. Die getrocknete Masse wird gepulvert; sie stellt ein weiß-gelbliches, sehr stark hygroskopisches Pulver dar.

Von Proteinen wurde Gelatine sowie verschiedene Sera angewandt. Das Blut wurde zum Teil vom Schlachthof bezogen und das Serum durch Gerinnenlassen des Blutes gewonnen. Zur Entfernung störender Beimengungen wurde nochmals zentrifugiert. Zur Gewinnung von Seren der Laboratoriumstiere wurde das Blut direkt in Zentrifugengläsern aufgefangen, durch wenige Minuten langes Stehen bei Zimmertemperatur gerinnen gelassen, mit Hilfe einer Platinnadel die Adhäsionen an der Oberfläche gelöst und sofort zentrifugiert. Es gelingt so in sehr kurzer Zeit die Herstellung eines vollständig klaren Serums, was besonders auch für die Gewinnung der Sera der vorbehandelten Tiere von großem Werte ist. — Für die Versuche mit Gelatine diente die Gelatina sterilisata Merck.

I. Versuche mit Diphtherietoxin und -antitoxin.

Angewandt wurde Diphtherietoxin, Höchst, 4fach und 6fach, sowie ein 2faches Diphtherietoxin des Sächs. Serumwerkes Dresden. Das Diphtherieantitoxin stammte von Höchst, 400fach.

Zur Herstellung des Diphtheriebacillenpeptons wurde die noch feuchte Masse von zum Teil lebenden Diphtheriebacillen mit der gleichen Menge 70%iger Schwefelsäure übergossen und 3 Tage im Brutschrank belassen. Es wurde vom Rückstand abfiltriert und aus der Lösung die Schwefelsäure mit Baryt quantitativ gefällt. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck bei 40° des Wasserbades bis fast zur Trockene eingeengt und der Rückstand über Schwefelsäure im Vakuumexsikkator vollends getrocknet.

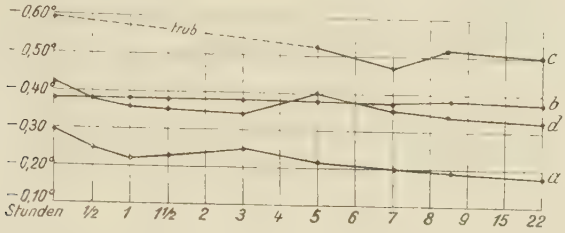
Das Pepton gibt noch in ziemlich starken Verdünnungen mit Diphtherietoxin sowie mit Antidiphtherieserum starke Niederschläge; mit Pferdeserum gemischt, gibt es keinen Niederschlag. Andere untersuchte Peptone gaben mit Diphtherietoxin und Antitoxin keine Niederschläge mit Ausnahme von Pepton aus Schweineborsten, das mit Diphtherietoxin einen Niederschlag gibt, wenn auch in geringerem Maße wie das Pepton aus Diphtheriebacillen.

a) 1,0 ccm Diphtherietoxin 2 fach,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
6,0 » Kochsalzlösung.

b) 1,0 ccm Diphtherietoxin 2 fach,
0,5 » Gelatinepeptonlösung 10%ig,
6,0 » Kochsalzlösung.

c) 1,0 ccm Diphtherietoxin 2 fach,
0,5 » Caseinpeptonlösung 10%ig,
6,0 » Kochsalzlösung.

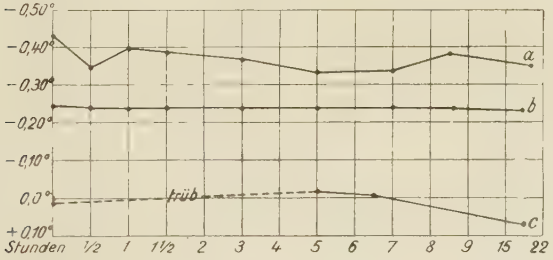
d) 1,0 ccm Diphtherietoxin 2 fach,
0,5 » Edestinpeptonlösung 10%ig,
6,0 » Kochsalzlösung.



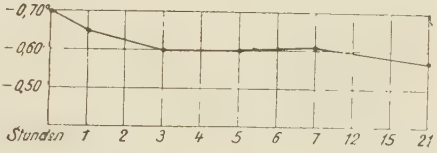
a) 1,0 ccm Diphtherietoxin 2 fach,
0,5 » Eieralbuminpeptonlösung 10%ig,
6,0 » Kochsalzlösung.

b) 1,0 ccm Diphtherietoxin 2 fach,
6,5 » Kochsalzlösung.

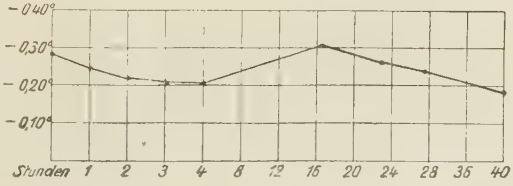
c) 0,1 ccm Diphtherietoxin 2 fach,
1,0 » Diphtheriepeptonlösung 0,5%ig,
6,4 » Kochsalzlösung.



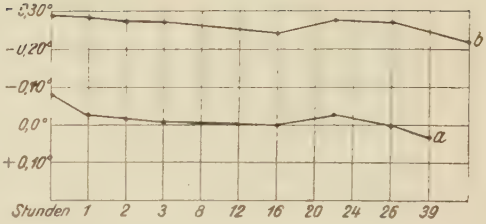
2,0 ccm Diphtherietoxin 4 fach,
0,5 » Hammelserum,
4,0 » Kochsalzlösung.



0,5 ccm Diphtherietoxin 6 fach,
0,5 » Meerschweinchenserum,
6,0 » Kochsalzlösung.

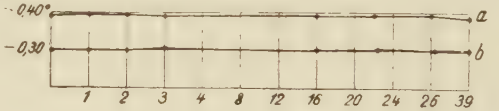


a) 0,5 ccm Diphtherietoxin,
0,25 » Diptheriepepton 1 % ig,
7,0 » Kochsalzlösung.
b) 0,5 ccm Diphtherietoxin 6 fach,
0,5 » Pferdeserum,
0,25 » Diphtheriepepton 1 % ig,
6,5 » Kochsalzlösung.



a) 0,5 ccm Diphtherietoxin 6 fach,
0,5 » Diphtherieserum (400 mal)
0,25 » Diphtheriepeptonlösung 1 % ig,
6,5 » Kochsalzlösung.

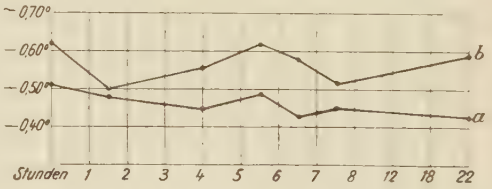
b) 0,5 ccm Diphtherieserum (400 fach).
0,25 » Diphtheriepeptonlösung 1 % ig,
7,0 » Kochsalzlösung.



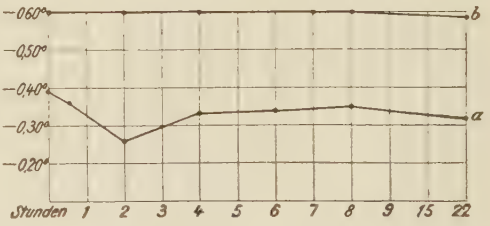
II. Versuche mit Antistreptococcenserum.

Angewandt wurde das Antistreptococcenserum. Höchst, nach Ruppel & Meyer.

a) 1,0 ccm Antistreptococcenserum,
0,5 » Gelatinelösung 1 % ig,
2,5 » Kochsalzlösung.
b) 1,0 ccm Antistreptococcenserum,
0,5 » Pferdeserum,
2,5 » Kochsalzlösung.



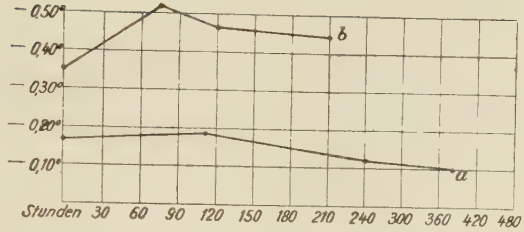
a) 0,5 ccm Antistreptococcenserum,
0,5 » Eieralbuminpeptonlösung 10 % ig,
5,5 » Kochsalzlösung.
b) 0,5 ccm Pferdeserum, normal,
0,5 » Eieralbuminpeptonlösung 10 % ig,
5,5 » Kochsalzlösung.



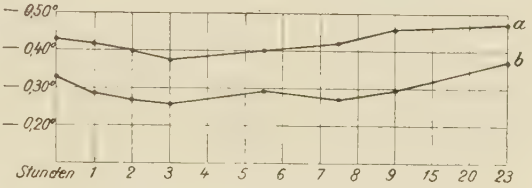
III. Versuche mit Tuberkulin.

Angewandt wurde Tuberculinum Kochii der Farbwerke Höchst.

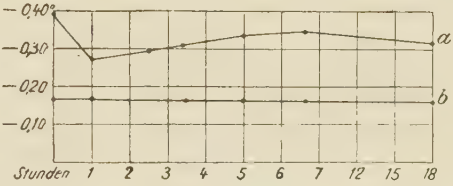
a) 0,5 ccm Tuberkulin,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
6,0 » Kochsalzlösung.
b) 0,5 ccm Tuberkulin,
0,5 » Hammelserum,
6,0 » Kochsalzlösung.



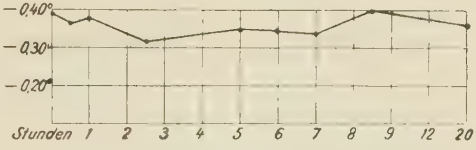
a) 0,5 ccm Tuberkulin,
0,5 » Gelatinepeptonlösung 10%ig,
3,0 » Kochsalzlösung
b) 0,5 ccm Tuberkulin,
0,5 » Gelatinelösung 1%ig,
3,0 » Kochsalzlösung.



a) 0,5 ccm Tuberkulin,
0,5 » Eieralbuminpeptonlösung 10%ig,
3,0 » Kochsalzlösung.
b) 0,5 ccm Tuberkulin,
3,5 » Kochsalzlösung.



0,5 ccm Tuberkulin,
0,5 » Pferdeserum,
3,0 » Kochsalzlösung.

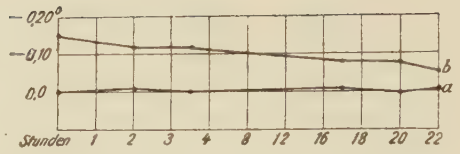


IV. Versuche mit Pyocyanase.

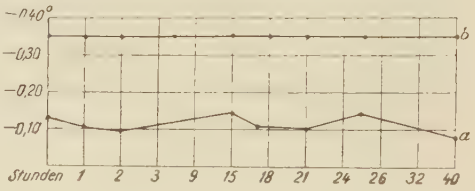
Wie der folgende Versuch zeigt, wird Seidenpepton nicht gespalten, dagegen verändert Pferde- und Hammelserum sein Drehungsvermögen.

Hund 22, 11600 g, erhält am 31. I. 1 ccm Pyocyanase subcutan. 3. II. Hund sehr matt, frißt nicht. 5. II. 1 ccm Pyocyanase subcutan. 7. II. Hund sehr krank. Blut entnommen: Serum 22b. Das Serum hemmt die Wirkung der Pyocyanase auf Hammelserum. Versuch 14.

a) 0,1 ccm Pyocyanase,
0,25 » Seidenpeptonlösung 10 % ig,
3,8 » Kochsalzlösung.
b) 0,1 ccm Pyocyanase,
0,25 » Pferdeserum,
3,8 » Kochsalzlösung.



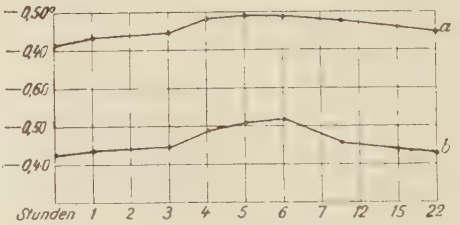
a) 0,5 ccm Pyocyanase 1:10 verdünnt (mit Kochsalzlösung)
0,3 » Hammelserum,
5,7 » Kochsalzlösung.
b) 0,5 ccm Pyocyanase 1:10,
0,5 » Serum 22b,
0,3 » Hammelserum,
5,2 » Kochsalzlösung.



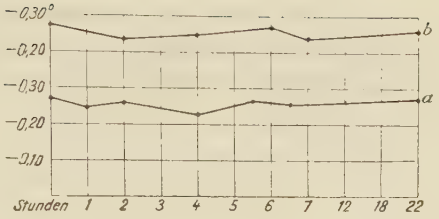
V. Versuche mit Ricin.[10])[11])

Angewandt wurde Ricin Merck. Die Lösung wurde so hergestellt, daß feingepulvertes Ricin mit physiologischer Kochsalzlösung gemischt wurde. Die Mischung kam dann 2 bis 6 Stunden in den Brutschrank; vom etwaigen Rückstand wurde abfiltriert. Außer den optischen Versuchen wurden Dialyseversuche ausgeführt. Die zu dialysierende Flüssigkeit kam in ein Säckchen aus Fischblase. Dialysiert wurde gegen destilliertes Wasser. Wurden 50 ccm 5%iger Eiereiweißlösung mit 0,1 g Ricin gemischt und nach Überschichtung mit Toluol 2 Tage im Brutschrank gegen destilliertes Wasser dialysiert, so zeigte die Außenflüssigkeit starke Biuretreaktion. Kontrollen mit Eiereiweißlösung oder Ricin allein ergaben ein negatives Resultat, selbst nach 16 Tagen.

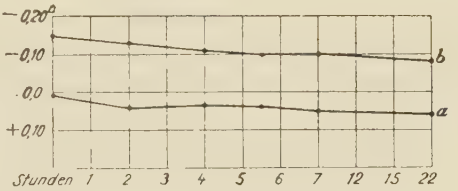
a) 5,5 ccm Ricinlösung,
1,0 » Pferdeserum.
b) 5,5 ccm Ricinlösung,
1,0 » Hundeserum.



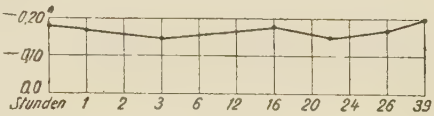
a) 2,0 ccm Ricinlösung,
0,5 » Gelatinepeptonlösung 10 %ig,
4,5 » Kochsalzlösung.
b) 1,0 ccm Ricinlösung,
0,5 » Pferdeserum,
2,5 » Kochsalzlösung.



a) 3,5 ccm Ricinlösung,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10 %ig.
b) 3,5 ccm Ricinlösung,
0,5 » Edestinpeptonlösung 10 %ig.



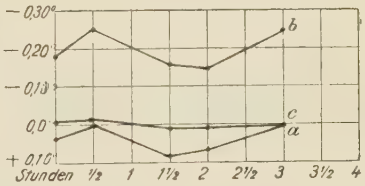
6,5 ccm Ricinlösung,
0,5 » Meerschweinchenserum,



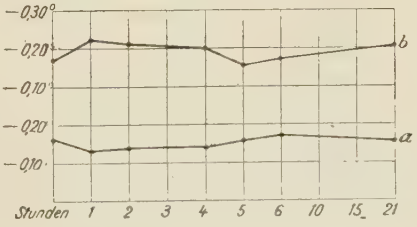
VI. Versuche mit Cobragift.

Die Lösungen wurden so hergestellt, daß fein pulverisiertes Cobragift mit Kochsalzlösung gemischt wurde. Die Mischung wurde 16 Stunden in den Brutschrank gebracht. Vom etwaigen ungelösten Rückstand wurde abfiltriert.

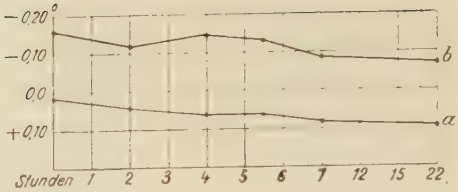
a) 2,0 ccm Cobragiftlösung,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.
b) 2,0 ccm Cobragiftlösung,
0,5 » Gelatinepeptonlösung 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.
c) 2,0 ccm Cobragiftlösung,
6,0 » Kochsalzlösung.



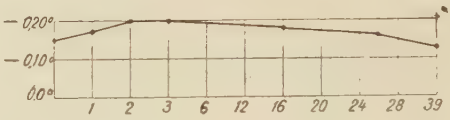
a) 0,5 ccm Cobragiftlösung,
0,5 » Hundeserum,
3,0 » Kochsalzlösung.
b) 0,5 ccm Cobragiftlösung,
0,5 » Pferdeserum,
3,0 » Kochsalzlösung.



a) 3,5 ccm Cobragiftlösung,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig.
b) 3,5 ccm Cobragiftlösung,
0,5 » Edestinpeptonlösung.



6,5 ccm Cobragiftlösung,
0,5 » Meerschweinchenserum.



Aus der Reihe der Versuche über die Spaltung von Seidenpepton mit aus Mikroorganismen gewonnenen Fermenten seien vorläufig diejenigen über den Einfluß von Rotzbacillenextrakt auf einige Peptone angeführt.

Versuche mit Rotzbacillenextrakt.

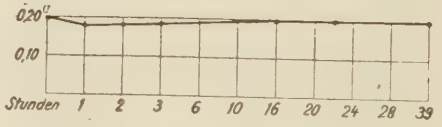
Angewandt für den ersten Versuch 1 Monat alter konzentrierter Rotzbacillenextrakt, Bromberg, für den zweiten Versuch Extrakt des Pathol. Inst. der Tierärztl. Hochschule. Berlin.

a) 1,0 ccm Rotzextrakt (Bromberg),
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.

b) 1,0 ccm Rotzextrakt (Bromberg),
0,5 » Gelatinepeptonlösung 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.

c) 1,0 ccm Rotzextrakt (Bromberg),
0,5 » Edestinpeptonlösung 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.

1,0 ccm Rotzbacillenextrakt (Pathol. Inst.).
0,5 » Meerschweinchenserum,
5,5 » Kochsalzlösung.



In einer Reihe weiterer Versuche haben wir festgestellt, daß das Plasma von Tieren, die mit Eiereiweißlösung vorbehandelt worden sind, sich ebenso verhält wie das Serum.

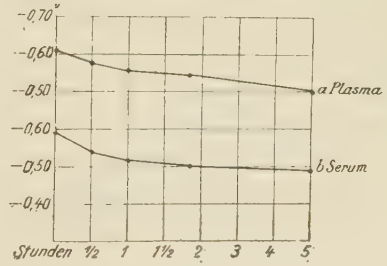
Vergleichung der spaltenden Wirkung von Plasma und Serum.

Zu den Versuchen diente das Blut eines Hundes von 14000 g, dem 20 Tage vorher 10 ccm einer 20%igen Eiereiweißlösung in physiologischer Kochsalzlösung subcutan injiziert worden waren. Das Blut wurde in Zentrifugengläsern aufgefangen und wie üblich behandelt. Die Gläser zur Aufnahme des Plasmas waren mit 0,02 g Ammoniumoxalat für 10 ccm Blut beschickt worden. Das erhaltene Plasma war ganz hämoglobinfrei. Zu den Versuchen wurden je 1 ccm Plasma oder Serum, 0,5 ccm der entsprechenden 10%igen Peptonlösung und die zum Auffüllen nötige Menge physiologischer Kochsalzlösung angewandt.

Vor 18 Tagen mit 10 ccm 20%iger Eiereiweißlösung subcutan gespritzter Hund [23], Bastard, ♂, 13900 g, b. Blutentnahme 14200 g.

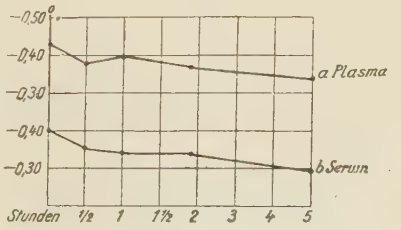
a) 0,5 ccm Oxalatplasma (2‰ Oxalat) [23],
0,5 » Edestinpeptonlösung 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.

b) 0,5 ccm Serum [23],
0,5 » Edestinpeptonlösung 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.

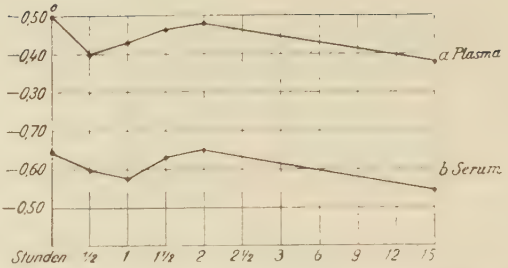


a) 1,0 ccm Oxalatplasma [23],
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
6,0 » Kochsalzlösung.

b) 1,0 ccm Serum [23],
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig
6,0 » Kochsalzlösung.



a) 1,0 ccm Oxalatplasma [23],
0,5 » Gelatinepeptonlösung 10 %ig,
6,0 » Kochsalzlösung.
b) 1,0 ccm Serum [23],
0,5 » Gelatinepeptonlösung 10 %ig,
6,0 » Kochsalzlösung.



Endlich beschäftigte uns die Frage, ob das Auftreten der Fermente im Plasma resp. Serum nach parenteraler Zufuhr von Proteinen resp. Peptonen zusammenfällt resp. den Höhepunkt erreicht mit dem Auftreten anderer Phänomene, wie z. B. der Präzipitinbildung. Wie die folgenden Versuche zeigen, scheinen in der Tat derartige Beziehungen vorhanden zu sein.

Versuche über die Zeitdauer bis zum Auftreten der spaltenden Wirkung. a) Versuche an Hunden.

Hund 19, 7000 g, erhält am 20. I. 5 ccm Hammelserum subcutan. Es wird ihm Blut entnommen am 24. I.: Serum 19a; am 26. I. Serum 19b; am 31. I. Serum 19c. Die folgenden Versuche zeigen die Wirkung der verschiedenen Sera auf Seidenpepton, Hammelserum, Pferdeserum, außerdem einen Versuch mit Gelatinepepton. Es ergab sich, daß vor dem 6. Tage eine Spaltung nicht auftritt.

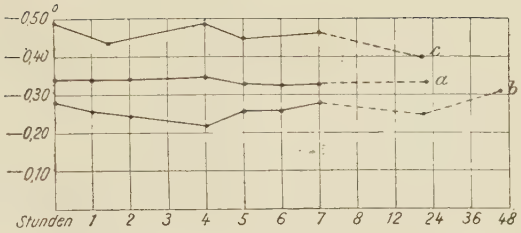
Hund 20, 8800 g, erhält am 21. I. 5 ccm Rinderserum subcutan. Es wird ihm Blut entnommen am 25. I.: Serum 20a, am 28. I. 20b, am 20. II. Serum 20d. Versuche 7 und 8 bestätigen die Ergebnisse an Hund 19; außerdem zeigt sich, daß noch das nach 26 Tagen gewonnene Serum (20d) spaltende Wirkung hat.

Hund 19. 7000 g. 20. I. 5 ccm Hammelserum subcutan,
24. I. Blut entnommen, Serum 19a,
26. I. » » » 19b,
31. I. » » » 19c.

a) 1,0 ccm Serum 19a,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
2,5 » Kochsalzlösung.

b) 1,0 ccm Serum 19b,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
2,5 » Kochsalzlösung.

c) 1,0 ccm Serum 19c,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
2,5 » Kochsalzlösung.



Hund 19.

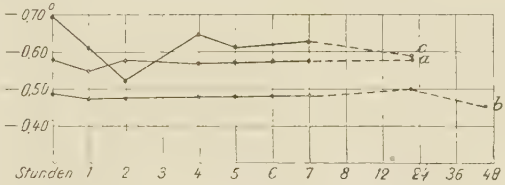
a) 1,0 ccm Serum 19a,
0,5 » Hammelserum,
2,5 » Kochsalzlösung.
b) 1,0 ccm Serum 19b,
0,5 » Hammelserum,
2,5 » Kochsalzlösung.

Hund 19.

a) 1,0 ccm Serum 19a,
0,5 » Pferdeserum,
2,5 » Kochsalzlösung,

b) 1,0 ccm Serum 19b,
0,5 » Pferdeserum,
2,5 » Kochsalzlösung,

c) 1,0 ccm Serum 19c,
0,5 » Gelatinepepton 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.

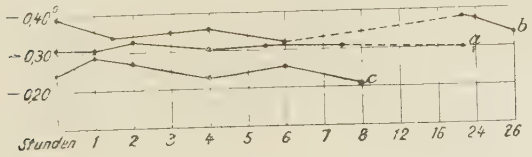


Hund 20. 8800 g. 21. I. 5 ccm Rinderserum subcutan,
25. I. Blut entnommen, Serum 20a,
28. I. » » » 20b,
16. II. » » » 20d.

a) 1,0 ccm Serum 20a,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.

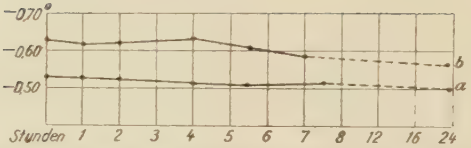
b) 1,0 ccm Serum 20b,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.

c) 1,0 ccm Serum 20d,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
5,5 » Kochsalzlösung.



Hund 20.

a) 1,0 ccm Serum 20a,
0,5 » Pferdeserum,
5,5 » Kochsalzlösung.
b) 1,0 ccm Serum 20b,
0,5 » Pferdeserum,
5,5 » Kochsalzlösung.



Serum 20a spaltete Hammelserum und Rinderserum nicht merklich.

Serum 20b mit Hammelserum und Rinderserum gab sehr schnell Trübungen, sodaß Ablesungen unmöglich waren.

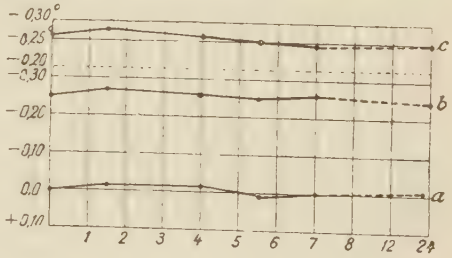
b) Versuch an Kaninchen.

Kaninchen 1 K, 1700 g, erhält am 26. I. 2,5 ccm Hammelserum subcutan. Am 31. I. Blut entnommen. Der Versuch zeigt, daß dieses Serum nur sehr geringe spaltende Wirkung besitzt. Läßt man gleiche Mengen dieses Serums und Hammelserum im Brutschrank, so tritt selbst nach 24 Stunden keine Präzipitatbildung auf.

Kaninchen 2 K, 1600 g, erhält am 26. I. 2,5 ccm Rinderserum subcutan. Blut entnommen am 28. I.: Serum 2 Ka: am 2. II. Serum 2 Kb; Versuche 10 und 11 zeigen, daß erst das nach 7 Tagen entnommene Serum spaltet. Dementsprechend gibt Serum 2 Ka + die gleiche Menge Rinderserum selbst nach 24stündigem Stehen im Brutschrank kein Präzipitat. 0,1 ccm Serum 2 Kb + 0,1 ccm Rinderserum nach 2stündigem Aufenthalt im Brutschrank Präzipitat; 0,1 ccm des auf das Doppelte mit Kochsalzlösung verdünnten Serums 2 Kb + 0,1 ccm Rinderserum ebenso. Bei Verdünnungen des Serums 2 Kb auf das 4 und 8fache tritt nach Zusammenbringen mit der gleichen Menge Rinderserum nach 24stündigem Verweilen im Brutschrank Präzipitatbildung auf, nicht jedoch bei der 16fachen Verdünnung.

Kaninchen 1 K. 1700 g. 26. I. 2,5 ccm Hammelserum subcutan, 31. I. Blut entnommen, Serum 1 Ka.

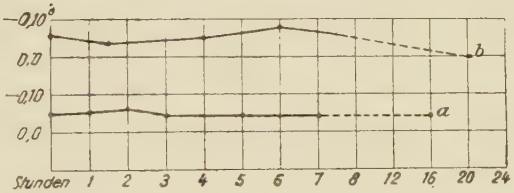
a) 0,2 ccm Serum 1 Ka,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig
5,5 » Kochsalzlösung.
b) 0,2 ccm Serum 1 Ka,
0,5 » Pferdeserum,
5,5 » Kochsalzlösung.
c) 0,2 ccm Serum 1 Ka,
0,5 » Hammelserum,
5,5 » Kochsalzlösung.



Nach 24stündigem Stehen im Brutschrank gleicher Mengen Serum 1 K a und Hammelserum trat keine Präzipitinbildung auf.

Kaninchen 2 K. 1600 g. 26. I. 2,5 ccm Rinderserum subcutan,
28. I. Blut entnommen, Serum 2 K a,
2. II. » » » 2 K b.

a) 0,2 ccm Serum 2 K a,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
3,3 » Kochsalzlösung.
b) 0,2 ccm Serum 2 K b,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
3,3 » Kochsalzlösung.



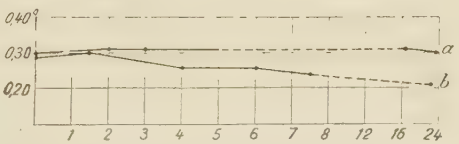
Serum 2 K a gibt, mit der gleichen Menge Rinderserum gemischt, nach 24stündigem Stehen im Brutschrank kein Präzipitat.

Serum 2 K b 0,1 ccm + 0,1 Rinderserum: nach 2 Stunden Präzipitat: ebenso 0.1 ccm des auf das Doppelte mit Kochsalzlösung verdünnten Serums 2 K b + 0,1 ccm Rinderserum.

Nach 24 Stunden ist auch Präzipitatbildung in den Mischungen der 4- und 8fachen Verdünnung des Serums 2 K b und der gleichen Menge Rinderserum eingetreten.

Kaninchen 2 K.

a) 0.2 ccm Serum 2 K a,
0,2 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
3,3 » Kochsalzlösung.
b) 0,2 ccm Serum 2 K b,
0,5 » Seidenpeptonlösung,
3,3 » Kochsalzlösung.



Schließlich seien noch einige Versuche mitgeteilt, die den Einfluß der subcutanen Zufuhr von Hefepreßsaft zeigen.

Mit Hefepreßsaft vorbehandelter Hund.

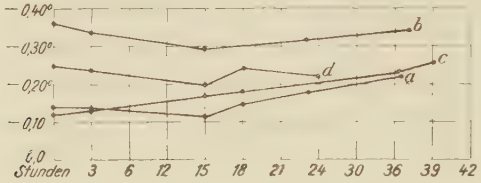
Hund 25, 9300 g, erhält am 12. II. 1 ccm Hefepreßsaft subcutan. Am 21. II. wird Blut entnommen. Dasselbe gerinnt nicht bei 2stündigem Stehen bei Zimmertemperatur, auch nicht bei 2tägigem Stehen im Eisschrank. Mit dem erhaltenen Plasma 25 a wurde der erste Versuch ausgeführt. Am 23. II. wird wiederum Blut entnommen. Dieses gerinnt. Das Serum 25 b dient zum zweiten Versuch.

a) 0,5 ccm Plasma 25 a,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
5,5 » physiol. Kochsalzlösung.

b) 0,5 ccm Plasma 25 a,
0,5 » Gelatinepeptonlösung 10%ig,
5,5 » physiol. Kochsalzlösung.

c) 0,5 ccm Plasma 25 a,
0,5 » Glycyl-l-tyrosionlösung ($^1/_{4000}$-Mol.),
5,5 » physiol. Kochsalzlösung.

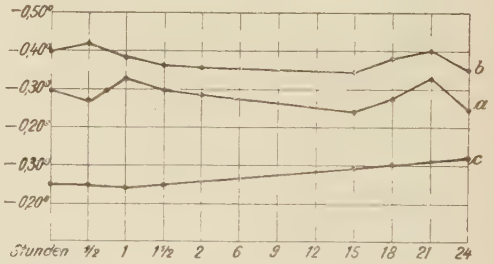
d) 0,5 ccm Plasma 25 a,
0,5 » Gelatinelösung 1%,
5,5 » physiol. Kochsalzlösung.



a) 1,0 ccm Serum 25 b,
0,5 » Seidenpeptonlösung 10%ig,
2,5 » Kochsalzlösung.

b) 1,0 ccm Serum 25 b,
0,5 » Gelatinepeptonlösung,
2,5 » Kochsalzlösung.

c) 1,0 ccm Serum 25 b,
0,5 » Glycyl-l-tyrosinlösung ($^1/_{8000}$-Mol.),
2,5 » Kochsalzlösung.



Hervorgehoben sei, daß die mitgeteilten Versuche nur einem geringen Teil der überhaupt ausgeführten Versuche entsprechen. Nur dann, wenn der Verlauf eines Versuches sich immer gleich gestaltete, wurde er aufgenommen. Ausdrücklich betont sei nochmals, daß wir vorläufig von «Abbau» und von «Fermenten» sprechen, weil wir glauben, daß eine derartige Annahme die größte Berechtigung hat.

Literatur.

1. Emil Abderhalden, Die Anwendung der «optischen Methode» auf dem Gebiet der Immunitätsforschung. Med. Klinik, 1909, Nr. 41.

2. Emil Abderhalden u. Carl Brahm, Serologische Studien mit Hilfe der optischen Methode. VIII. Zeitschr. f. physicl. Chemie, 1910, Bd. LXIV, S. 429.

3. Emil Abderhalden u. H. Deetjen, Über den Abbau einiger Polypeptide durch die Blutkörperchen des Pferdes. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1907, Bd. LIII, S. 294.

4. Emil Abderhalden u. Berthold Oppler, Über das Verhalten einiger Polypeptide gegen Blutplasma und -Serum vom Pferde. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1907, Bd. LIII, S. 294.

5. Emil Abderhalden u. Ludwig Pincussohn, Über den Gehalt des Kaninchen- und Hundeplasmas an peptolytischen Fermenten unter verschiedenen Bedingungen. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1909. Bd. LXI, S. 200.

6. Dieselben, Über den Gehalt des Hundeblutserums an peptolytischen Fermenten unter verschiedenen Bedingungen. III. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1909, Bd. LXII, S. 120.

7. Dieselben, Serologische Studien mit Hilfe der optischen Methode. IX. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1910, Bd. LXIV, S. 433.

8. Emil Abderhalden u. Hans Pringsheim, Studien über die Spezifizität der peptolytischen Fermente bei verschiedenen Pilzen. I. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1909, Bd. LIX, S. 249.

9. Emil Abderhalden u. Wolfgang Weichardt, Über den Gehalt des Kaninchenserums an peptolytischen Fermenten unter verschiedenen Bedingungen. II. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1909, Bd. LXII, S. 120.

10. Martin Jacoby, Chemische Natur des Ricins. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. XLVI, S. 28—40.

11. Derselbe, Über Ricinimmunität. I. Hofmeisters Beiträge, Bd. I, S. 51—82; II., ebenda, Bd. II, S. 535—42.

12. Obermayer u. Pick, Über die chemische Grundlage der Arteigenschaften der Eiweißkörper. Wiener klin. Wochenschrift, 1906, S. 327.

Vorliegende Arbeit beruht auf Versuchen, die im Wintersemester 1909 10 im Physiologischen Institut der Kgl. Tierärztlichen Hochschule zu Berlin ausgeführt wurden. Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Abderhalden, für sein stetes Interesse und seine zahlreichen Anregungen meinen besten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Verfasser dieser Arbeit, Ludwig Pincussohn, wurde am 2. Juni 1873 als Sohn des Kaufmannes, späteren Rentiers und Stadtverordneten Gustav Adolf Pincussohn und seiner Ehefrau Amanda, geb. Falk, zu Berlin geboren. Seine Vorbildung erhielt er auf dem Askanischen und Französischen Gymnasium zu Berlin; auf letzterem erhielt er im Herbst 1892 das Zeugnis der Reife. Er genügte sodann seiner Dienstpflicht beim ersten Gardedragonerregiment zu Berlin und widmete sich dem Studium der Naturwissenschaften in Berlin und München. Am 17. März 1897 wurde er in Berlin mit einer Arbeit «Zur Kenntnis der Pyridinverbindungen» zum Doctor philosophiae cum laude promoviert. Er war dann längere Zeit in der chemischen Technik tätig, wandte sich aber im Frühjahr 1905, von dem Wunsche beseelt, auf dem Grenzgebiete von Chemie und Medizin tätig sein zu können, auch dem Studium der Medizin zu. Er bestand im Sommer 1906 die ärztliche Vorprüfung, am 15. Mai 1909 die ärztliche Hauptprüfung, beide mit Prädikat «gut». Außer diesen Studien war er von 1905 bis 1908 als Volontär-Assistent in der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität (Prof. Bickel) zu Berlin beschäftigt. Seit April 1908 ist er Assistent bei Prof. Dr. Abderhalden. Seit Beendigung der Staatsprüfung hat er behufs Ableistung des praktischen Jahres in dem Medizinisch-poliklinischen Institut der Universität (Geheimrat Senator) als Praktikant gearbeitet. Am 16. Mai 1910 erhielt er die Approbation als Arzt. Seit 1901 ist er verheiratet.

Während seiner medizinischen Studienzeit hörte Verfasser die Vorträge und Übungen folgender Professoren und Dozenten (sämtlich zu Berlin):

Beitzke, Bickel, Bumm, Engelmann †, Fränkel, Grawitz, Heubner, Hertwig, Hildebrand, van't Hoff, Horstmann, Kraus, W. Krause †, Kroemer, Lesser, Lewandowsky, Liebreich †, Loeb, L. Michaelis, Neuberg, Orth, Passow, Pick, Poll, Rubner, Schulze, Stöckel, Straßmann, H. Virchow, Waldeyer, Wassermann, Ziehen.